

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年12月14日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-380465

出 願 人

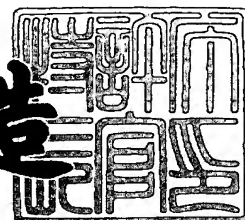
Applicant(s):

日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

2001年10月26日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3093450

【書類名】 特許願

【整理番号】 12A119

【提出日】 平成12年12月14日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 P C R 増幅された塩基配列の検出方法及び検出キット

【請求項の数】 5

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町 6 丁目 8 1 番地 日立ソフト
 ウェアエンジニアリング株式会社内

 【氏名】 中尾 素直

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町 6 丁目 8 1 番地 日立ソフト
 ウェアエンジニアリング株式会社内

 【氏名】 水野 克也

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町 6 丁目 8 1 番地 日立ソフト
 ウェアエンジニアリング株式会社内

 【氏名】 吉井 淳治

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町 6 丁目 8 1 番地 日立ソフト
 ウェアエンジニアリング株式会社内

 【氏名】 浅井 昭弘

【特許出願人】

 【識別番号】 000233055

 【氏名又は名称】 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100102576

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡辺 敏章

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9722155

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 PCR増幅された塩基配列の検出方法及び検出キット

【特許請求の範囲】

【請求項1】 PCR増幅された塩基配列の検出方法において、

サンプルに、それぞれ異なる塩基配列をPCR増幅するのに適したプライマーの組を複数混合してPCR増幅を行うステップと、

前記PCRに用いたプライマーがスポットされた基板と前記ステップでPCR増幅された塩基配列が入っている溶液とを用いて、当該基板上にスポットされたプライマーと前記PCR増幅された塩基配列とのハイブリダイゼーション反応を行うステップと、

前記基板上でハイブリダイゼーションが生じたスポットを検出するステップとを含むことを特徴とするPCR増幅された塩基配列の検出方法。

【請求項2】 請求項1記載のPCR増幅された塩基配列の検出方法において、前記基板上でハイブリダイゼーションが生じたスポットを検出するステップは、蛍光物質を二本鎖DNAの間に入り込ませる処理を行うステップと、基板上のスポットに含まれている前記蛍光物質を励起して発生した蛍光を検出するステップとを含むことを特徴とするPCR増幅された塩基配列の検出方法。

【請求項3】 請求項1又は2記載のPCR増幅された塩基配列の検出方法において、前記プライマーは塩基数が10～30の範囲であることを特徴とするPCR増幅された塩基配列の検出方法。

【請求項4】 PCR増幅された塩基配列を検出するための検出キットであって、

第1の塩基配列を特異的にPCR増幅するのに適した2種類のプライマーと、前記第1の塩基配列と異なる第2の塩基配列を特異的にPCR増幅するのに適した2種類のプライマーとを含む3種類以上のプライマーが混合されている容器と、

前記容器に混合されているプライマーのうちの複数のプライマーをスポットした基板とからなることを特徴とする検出キット。

【請求項5】 請求項4記載の検出キットにおいて、前記プライマーは塩基

数が 1 0 ～ 3 0 の範囲であることを特徴とする検出キット。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、PCR法によって増幅した塩基配列を検出する方法及びその方法に用いる検出キットに関する

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

PCR (polymerase chain reaction) は、特定のDNAを特異的な2種類のプライマーを用いることによって増幅する方法である。PCRによって増幅したDNAは、アガロースゲルやアクリルアミドゲル等を用いた電気泳動を行った後に、核酸特異的な染色試薬で染色を行い検出するのが一般的である。2本鎖DNAの検出の場合は、通常はエチジウムブロマイド等の蛍光試薬をDNAの2本鎖の間に入り込ませた後にUV光源で励起すると、DNAの2本鎖に入り込んだエチジウムブロマイドが蛍光を発するために、それをCCDカメラ等で撮影することにより検出を行う。

【 0 0 0 3 】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、アガロースゲル等を用いた電気泳動法によるDNAの分離は、通常はその塩基数に基づく。つまり電気泳動法では、同じ塩基数のDNAはほとんど分離することができない。従って、鋳型となるDNAに対して、増幅を目的として複数のプライマーを混合した状態でPCRを行う場合に、増幅される可能性のあるDNA断片の塩基数が同じである場合には電気泳動で分離して検出することは不可能になる。

【 0 0 0 4 】

たとえば、図1 (a) に示した配列Aから配列BまでのDNA (1) と図1 (b) に示した配列Cから配列BまでのDNA (2) があったとして、これらのDNA (1) とDNA (2) の増幅を同時に行う場合には、配列A、配列Bの相補鎖、配列Cの3種類のプライマーを使用してPCRを行う。これは生物の変異の

検出（配列Aと配列Cのところで変異が起こりやすく、配列Bのところは保存領域）やウィルスの遺伝子の検出などに用いることができる。

【0005】

図2は、これら3種類のプライマーを同時に使用してPCRを行った後、電気泳動によって検出を行った結果を示す模式図である。図中の矢印は電気泳動の方向を示す。DNA(1)とDNA(2)の塩基数が異なる場合には、例えば図2(a)に示すように、電気泳動の結果、DNA(1)はゲル21上にバンド22として現れ、DNA(2)はバンド23として現れるので、両者を分離して検出することが可能である。一方、DNA(1)とDNA(2)の塩基数が同じである場合には、図2(b)に示すように、電気泳動してもゲル25上にバンド26は一つしか現れず、このバンド26中のDNAはどちらか一方のプライマーで特異的に増幅されたDNA(1)あるいはDNA(2)なのか、あるいは両方のプライマーで増幅されたDNA(1)とDNA(2)とが混合したものなのを知ることはできない。例えば、DNA(2)がDNA(1)の配列Aの箇所が変異によって配列Cになったものであるような場合には、DNA(1)とDNA(2)はその塩基数が全く同じであるため、電気泳動による分離、検出は極めて困難である。

【0006】

そのため、PCRを行うチューブを2つ用意して、一方のチューブにDNA(1)のPCR増幅用にプライマーとして配列Aと配列Bの相補鎖を入れ、他方のチューブにはDNA(2)のPCR増幅用にプライマーとして配列Cと配列Bの相補鎖を入れて個別にPCRを行うか、もしくは増幅される可能性のあるDNAの長さを変える必要がある。たとえば、図1(b)に示したDNA(2)の部分でのPCRを図1(c)に示すDNA(3)のような配列Dから配列Eの部分でPCRを行えば、DNA(1)とDNA(3)は塩基数が異なるため電気泳動した結果は図2(a)に示すようになり、どのDNAが増幅されたかのかを個別に検出することができるようになる。

【0007】

このように、従来の方法によると、1つのチューブ内で多種のプライマーを用

いてPCRした後の増幅の確認は、そのPCR産物の長さが同じである場合、どのプライマーによってDNAの増幅が行われたのかを確認することができなかった。また、電気泳動での確認ができるようにPCRを行う場合は、増幅すべきDNAの塩基数を変える必要があり、塩基数を変えることにより各々のDNAの増幅効率が変わる可能性があるためにDNA量の比較が難しくなる。

【0008】

本発明は、このような従来技術の問題点に鑑み、1つのチューブ内で多種のプライマーを用いて複数の塩基配列をPCR増幅した場合でも、増幅されたPCR産物の確認を容易かつ確実に行うことのできる方法及びその方法に用いる検出キットを提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明においては、サンプル中の複数の塩基配列を多種類のプライマーを用いて同時にPCR増幅し、当該PCRプライマーが植え付けてあるスライドガラス（バイオチップ）上で増幅した塩基配列とのハイブリダイゼーションを行うことにより、プライマーで増幅のあった塩基配列を個別に検出することで前記目的を達成する。PCR用のプライマーを固定化したバイオチップを用いることにより、そのプライマーによってPCR増幅がみられた塩基配列はそのプライマーが植え付けられている部分とハイブリダイゼーションするため、検出が可能となる。

【0010】

すなわち、本発明によるPCR増幅された塩基配列の検出方法は、サンプルに、それぞれ異なる塩基配列をPCR増幅するのに適したプライマーの組を複数混合してPCR増幅を行うステップと、前記PCRに用いたプライマーがスポットされた基板と前記ステップでPCR増幅された塩基配列が入っている溶液とを用いて、当該基板上にスポットされたプライマーとPCR増幅された塩基配列とのハイブリダイゼーション反応を行うステップと、基板上でハイブリダイゼーションが生じたスポットを検出するステップとを含むことを特徴とする。

【0011】

PCR産物の検出は、PCR産物が2本鎖になることを利用し、2本鎖特異的な

蛍光試薬等を用いて行うことができる。この方法によると、PCRで増幅されていないものは2本鎖を形成していないため検出されず、PCRで増幅されたもののみ特異的に検出を行うことができる。すなわち、基板上でハイブリダイゼーションが生じたスポットを検出するステップは、エチジウムブロマイド等の蛍光物質を二本鎖DNAの間に入り込ませる処理を行うステップと、基板上のスポットに含まれている蛍光物質を励起して発生した蛍光を検出するステップとを含むものとすることができる。

【 0 0 1 2 】

PCR増幅に用い、かつ基板上に固定化するプライマーは塩基数が10～30の範囲であるのが好ましい。プライマーの塩基数がこの範囲を超えると、ハイブリダイゼーションによる検出が困難になる。プライマーの塩基数を20～25とすると、より好ましい。プライマーの塩基数がこの範囲内にあると、PCR増幅した塩基配列を確実に検出することができる。

【 0 0 1 3 】

本発明による検出キットは、PCR増幅された塩基配列を検出するための検出キットであって、第1の塩基配列を特異的にPCR増幅するのに適した2種類のプライマーと、第1の塩基配列と異なる第2の塩基配列を特異的にPCR増幅するのに適した2種類のプライマーとを含む3種類以上のプライマーが混合されている容器と、容器に混合されているプライマーのうちの複数のプライマーをスポットした基板とからなることを特徴とする。

【 0 0 1 4 】

この検出キットを用いてPCR増幅された塩基配列を検出する際には、容器にサンプルを入れてPCR増幅し、その後基板上にスポットされたPCRプライマーとのハイブリダイゼーション反応を行ってPCR増幅された塩基配列を検出する。この検出キットに用いるプライマーは塩基数が10～30の範囲であることが好ましい。プライマーの塩基数がこの範囲を超えると、ハイブリダイゼーションによる検出が困難になる。プライマーの塩基数を20～25とすると、より好ましい。プライマーの塩基数がこの範囲内にあると、PCR増幅した塩基配列を確実に検出することができる。

【 0 0 1 5 】

【発明の実施の形態】

以下、図面を参照して本発明の実施の形態を説明する。

H C V (C 型 肝 炎 ウ イ ル ス) の ゲ ノ ム R N A を サ ン プ ル に 用 い て 、 実 験 を 行 っ た 。 H C V は ゲ ノ ム に R N A を も つ レ ト ロ ウ イ ル ス で 、 R N A 型 レ ト ロ ウ イ ル ス が ゆ え に 変 異 が 起 こ り や す く 、 ま た 実 際 に 様 々 な サ ブ タ イ プ が 知 ら れ て い る 。 現 在 の H C V の サ ブ タ イ プ 同 定 方 法 と し て は 、 そ の サ ブ タ イ プ に 特 有 の 配 列 を も つ 部 分 に サ ブ タ イ プ 特 有 の プ ラ イ マー を 設 計 し て P C R を 行 い 、 そ の 検 出 結 果 を も と に 同 定 す る 方 法 が 採 ら れ て い る 。 た と え ば 、 図 1 を 例 に と っ て 説 明 す る と 、 D N A (1) と D N A (2) の 配 列 A 、 配 列 C が そ れ ぞ れ サ ブ タ イ プ 特 異 的 な プ ラ イ マー と な り 、 配 列 B の 相 補 鎖 は H C V に 共 通 な 配 列 と な る 。

【 0 0 1 6 】

H C V の ゲ ノ ム 配 列 3 種 類 に つ い て の 一 部 分 を 下 記 に 示 す 。

H C V 名 称 : AF054256

TGCTCCGCTATGTACGTGGGGGATCTCTGCGGATCTATTTTCCTTGTCTCCCAGCTGTTACCTTCTCGCCT
CGCCGGCATGAGACAGTGCAGGACTGCAACTGCTCAATCTACCCGGCCATGTATCAGGTCACCGCATGGCT
TGGGATATGATGATGAACTGGTCACCTACAACAGCCCTAGTGGTGTGCGAGTTGCTCCGGATCCCACAAGCT
GTCGTGGACATGGTGGCGGGGGCCCACTGGGGAGTCCTGGCGGGCCTTGCTACTATTCCATGGTAGGGAAC
TGGGCTAAGGTTCTGATTGTGGCGCTACTCTTTGCCGGCGTTGACGGG (配列番号 1)

H C V 名 称 : AB008441

TGCTCCGCCATGTACGTGGGAGATCTCTGCGGATCTGTTTTCTCATCTCCCAGCTGTTACCTTCTCACCT
CGCCAGTATGAGACGGTACAAGACTGCAATTGCTCACTCTATCCCGGCCACGTATCAGGTCACCGCATGGCT
TGGGATATGATGATGAACTGGTCACCTACAACAGCCCTGGTGGTATCGCAGTTGCTCCGGATCCCACAAGCC
GTCGTGGACATGGTGGCGGGGGCCCACTGGGGAGTCCTAGCGGGCCTTGCTACTATTCCATGGTGGGGAAC
TGGGCTAAGGTTCTGATTGTGATGCTACTCTTTGCCGGCGTCGACGGG (配列番号 2)

H C V 名 称 : AF011753

TGCTCGGCCCTCTACGTGGGGGACCTGTGCGGGTCTGTCTTTCTTGGTCAACTGTTTACCTTCTCTCCC

AGGCGCCACTGGACGACGCAAGACTGCAATTGTTCTATCTATCCCGGCCATATAACGGGTCATCGCATGGCA
 TGGGATATGATGATGAAGTGGTCCCCTACGGCAGCGTTGGTGGTAGCTCAGCTGCTCCGGATCCCACAAGCC
 ATCATGGACATGATCGCTGGTGCTCACTGGGGAGTCCTGGCGGGCATAGCGTATTTCTCCATGGTGGGGAAC
 TGGGCGAAGGTCCTGGTAGTGCTGCTGCTATTTGCCGGCGTCGACGCG (配列番号 3)

【 0 0 1 7 】

これらの H C V ゲノムからそれぞれの名称を割り出すためには、全てのゲノム配列に共通の配列部分と、各ゲノム配列に特有の配列部分を利用する。ポジション 1 9 4 ~ 2 1 6 の部分は共通で TGCTCCGGATCCCACAAGC (配列番号 4) (1 9 塩基) となっているので、この部分を共通の部分として利用する。また、ポジション 4 1 ~ 6 0 についてはそれぞれのタイプの H C V で塩基配列が異なっており、AF054256 は TCCTTGCTCTCCAGCTGTTC (配列番号 5)、AB008441 は TCCTCATCTCCAGCTGTTC (配列番号 6)、AF011753 は TTCTTGTTGGTCAACTGTTT (配列番号 7) となっている。そこで、PCR 用のプライマーとしては共通部分 (ポジション 1 9 4 ~ 2 1 6) の相補鎖配列を共通のリバースプライマー (R-primer) とし、ポジション 4 1 ~ 6 0 までについてはそれぞれの 3 種類のフロントプライマー (F-primer) を用意し、PCR を行う。

【 0 0 1 8 】

H C V ゲノムに PCR を行う場合は、まず RNA を DNA に逆転写する必要がある。逆転写はランダムプライマーを使用し、逆転写酵素としてはスーパースクリプト 2 (GIBCOBRL 社) を使用した。このようにして作成した c D N A を鋳型として下記に示すように PCR を行った。

【 0 0 1 9 】

F - p r i m e r (1 0 p m o l / μ l)	1 μ l
R - p r i m e r (1 0 p m o l / μ l)	1 μ l
d N T P M I X (2 m M e a c h d N T P)	2 . 0 μ l
1 0 + P C R B u f f e r	2 . 5 μ l
T a q	0 . 1 μ l (0 . 5 U)
DDW	1 7 . 4 μ l

product (cDNA)	1 μ l
Total	25 μ l

サーマルサイクラー設定（下記①、②、③を1サイクルとして35サイクル程度）

① 94.0度1分

② 60.0度1分

③ 72.0度1分

【0020】

従来の方法では、このようにそれぞれのPCR産物が同じ長さである場合には分離して検出することができないため、F-primerを混合することはできず、3種類のF-primerの混合を行わずに、個別にPCRを行い、検出を行う必要があった。しかし、本発明によると、3種類のF-primerと共通のR-primerとを混合してPCRを行っても増幅されたPCR産物を特定することが可能となる。

【0021】

サンプルが入った1つのチューブ内に前記のすべてのプライマーをミックスしたものを添加し、その状態でPCRを行った。PCR産物はエタノール沈殿法により回収した後に、ハイブリダイゼーションを行うために4 x SSC、0.2% SDS溶液10 μ lに溶かした。

【0022】

図3は、本実験で用いたバイオチップの概略平面図である。バイオチップの作成はアミノプロピルエトキシシランでコートしたスライドガラス30にグルタルアルデヒドで架橋し、末端にアルデヒド基を露呈したものを使用した。また、スライドガラス30に植え付けるPCR用のプライマー31、32、33は、スライドガラス30への固定効率をあげるために末端をC6アミノ化したものを使用した。PCR用のプライマー31、32、33をスライドガラス30にスポットした後に、ホウ酸ナトリウムをリン酸緩衝液に溶かし、スライドガラス30にスポットしてあるプライマー31、32、33を固定した。なお、このときに使用

するプライマーの配列はプライマー 3 1 が TCCTTGCTCTCCCAGCTGTTC (配列番号 5) (AF054256)、プライマー 3 2 が TCCTCATCTCCCAGCTGTTC (配列番号 6) (AB008441)、プライマー 3 3 が TTCTTGTTGGTCAACTGTTT (配列番号 7) (AF011753) である。なお、スライドガラス 3 0 上へのプライマーの固定方法は、上述の方法には限定されない。

【 0 0 2 3 】

次に、前記のようにして PCR を行ったサンプルをバイオチップ 3 0 上に添加し、その上にゆっくりとカバーガラスをかぶせ 4 0 °C に保ったインキュベーター内で 3 時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションを行ったスライドガラスは 1 × SSC、0. 2 % SDS 溶液に浸し、カバーガラスが自然に剥がれるまで浸したのちに、0. 1 × SSC 中に 2 本鎖 DNA に特異的に反応する試薬、たとえばエチジウムブロマイド、サイバーグリーン、ヘキスト 3 3 2 5 8 等を添加した溶液にスライドガラスを浸し、染色を行った。これらの試薬はその構造が 2 本鎖 DNA の 2 重螺旋に特異的に入り込むことにより、2 本鎖 DNA の検出を可能にする。用いる試薬は特に上記のものに限られない。

【 0 0 2 4 】

図 4 は、本発明の方法による PCR 産物の検出方法を説明する図である。PCR で増幅された DNA 4 2 はスライドガラス 3 0 上に固定されたプライマーの部分 4 1 とハイブリダイゼーションを行う。この部分にハイブリダイゼーションを行った DNA 4 2 は PCR 産物であるがために相補鎖も同時に増幅されており、その相補鎖 4 3 もスライドガラス上のプライマーにハイブリダイゼーションをした DNA 4 2 とさらにハイブリダイゼーションをし、DNA の 2 本鎖を形成する。2 本鎖特異的な蛍光試薬 4 6 はこの 2 本鎖 DNA の部分 4 5 に入り込む。したがって、サンプル中に PCR 産物が存在すれば、スライドガラス 3 0 上の対応するプライマーのスポット位置に 2 本鎖 DNA が存在し、2 本鎖特異的な蛍光試薬も存在する。PCR で増幅されなかった DNA はスライドガラス 3 0 上の対応するプライマーとハイブリダイゼーションしないため、そのプライマーのスポット位置には 2 本鎖特異的な蛍光試薬も存在しない。すなわち、スライドガラスに蛍光励起光を照射したとき蛍光が発生するプライマーのスポットを知ることにより

P C R 増幅された D N A の種類を判別することができる。

【 0 0 2 5 】

2 本鎖特異的な蛍光試薬 4 6 による染色後、遠心機でスライドガラス 3 0 を乾燥させたのちに、図 4 で示すようにトランスイルミネーター等で蛍光試薬 4 6 を励起し、その蛍光を高感度な冷却 C C D カメラ等の撮像装置 4 7 で撮影した。撮影した結果は図 5 のようになった。この結果より、プライマー 3 1 とプライマー 3 3 でハイブリダイゼーションが生じていること、すなわち鋳型 D N A には AF05 4256 と AF011753 が存在していることを確認できた。

【 0 0 2 6 】

【発明の効果】

本発明によると、多種類のプライマーを使用して 1 チューブ内で P C R を行ったとしても、バイオチップ上でその増幅効率を個別に確認することができる。また、サンプルを P C R で増幅が可能のため、従来のバイオチップを用いる方法に比べて高感度なシステムを提供することができる。

【 0 0 2 7 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> HITACHI SOFTWARE ENGINEERING CO., LTD.

<120> DETECTION METHOD AND DETECTION KIT FOR PCR AMPLIFIED BASE SEQUENCE
S

<130> 12A119

<140>

<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 336

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 1

```

tgctccgcta tgtacgtggg ggatctctgc ggatctatct tccitgtctc ccagctgttc 60
accttctcgc ctgccggca tgagacagtg caggactgca actgctcaat ctaccccggc 120
catgtatcag gtcaccgcat ggcttgggat atgatgatga actggtcacc tacaacagcc 180
ctagtgggtg cgcagttgct ccggatccca caagctgtcg tggacatggt ggcgggggcc 240
cactggggag tcctggcggg ccttgcctac tattccatgg tagggaactg ggctaagggt 300
ctgattgtgg cgctactctt tgccggcggt gacggg                                     336
    
```

<210> 2

<211> 336

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 2

```

tgctccgcca tgtacgtggg agatctctgc ggatctgttt tcttcatctc ccagctgttc 60
accttctcac ctgccagta tgagacggta caagactgca attgctcact ctatcccggc 120
cacgtatcag gtcaccgcat ggcttgggat atgatgatga actggtcacc tacaacagcc 180
ctgggtggat cgcagttgct ccggatccca caagccgtcg tggacatggt ggcgggggcc 240
cactggggag tcctagcggg ccttgcctac tattccatgg tggggaactg ggctaagggt 300
ctgattgtga tgctactctt tgccggcgct gacggg                                     336
    
```

<210> 3

<211> 336

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 3

```
tgctcggccc tctacgtggg ggacctgtgc gggctctgtct ttcttggttg tcaactgttt 60
accttctctc ccaggcgcca ctggacgacg caagactgca attgttctat ctatcccggc 120
catataacgg gtcacgcat ggcatgggat atgatgatga actggteccc tacggcagcg 180
ttggtggtag ctcagctgct ccggatccca caagccatca tggacatgat cgctgggtgct 240
cactggggag tcctggcggg catagcgtat tcttccatgg tggggaactg ggcgaaggtc 300
ctggtagtgc tgctgctatt tgccggcgtc gacgcg 336
```

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 4

```
tgctccggat cccacaagc 19
```

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 5

```
tccttgtctc ccagctgttc 20
```

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 6

tcctcatctc ccagctgttc

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 7

ttcttgttgg tcaactgttt

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】

DNA を鋳型として PCR を行う際のプライマーに関する説明図。

【図 2】

電気泳動法による PCR 産物の検出方法を説明する図。

【図 3】

プライマーバイオチップの概略平面図。

【図 4】

プライマーバイオチップによる PCR 産物の検出方法を説明する図。

【図 5】

プライマーバイオチップの蛍光検出状態を示す図。

【符号の説明】

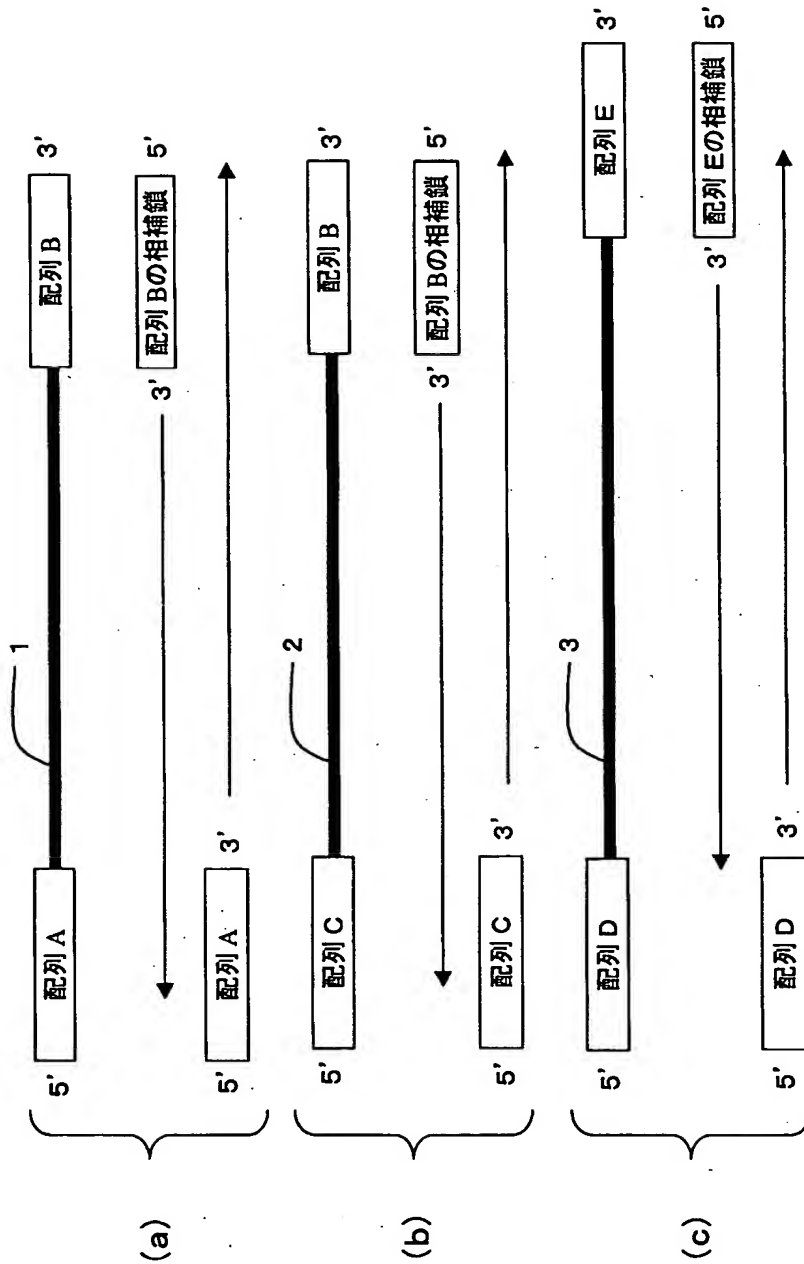
1, 2, 3 … DNA、2 1 … ゲル、2 2, 2 3 … バンド、2 5 … ゲル、2 6 …

バンド、30…スライドガラス、31, 32, 33…PCR用のプライマー、41…プライマーの部分、42…DNA、43…相補鎖、45…2本鎖DNAの部分、46…2本鎖特異的な蛍光試薬、47…撮像装置

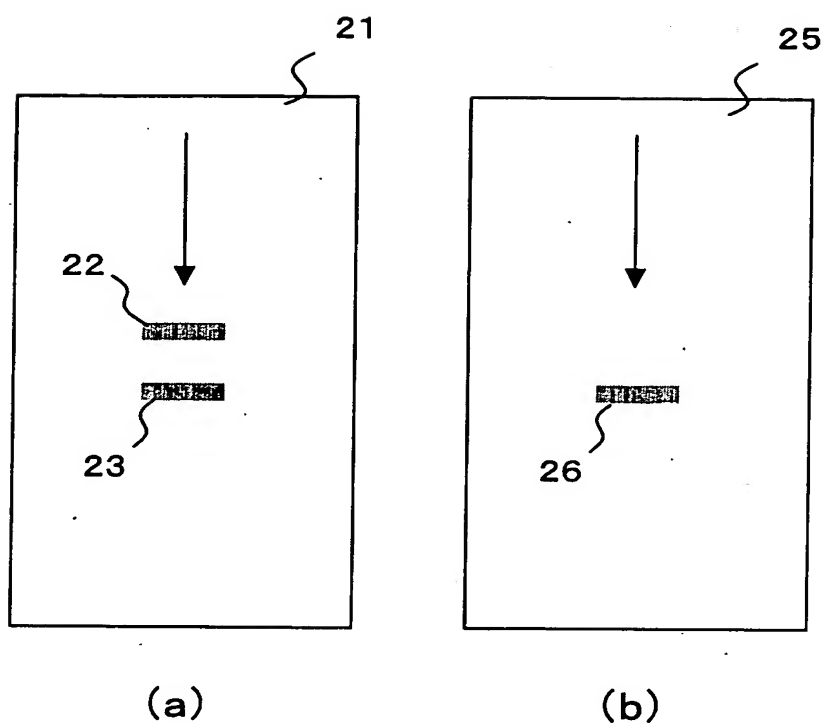
【書類名】

図面

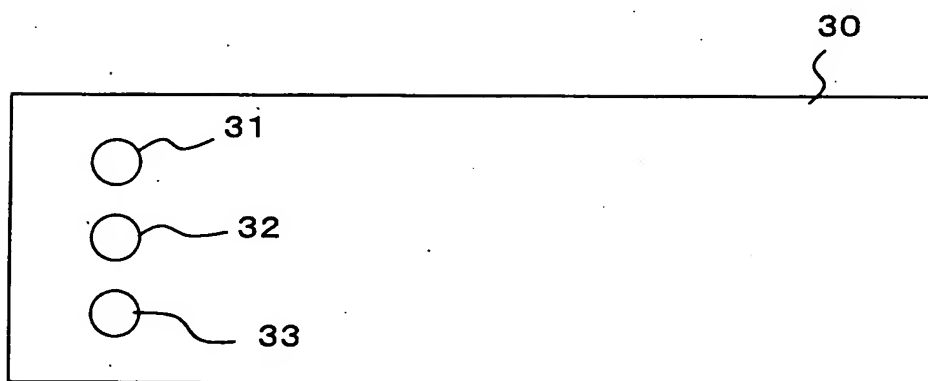
【図 1】



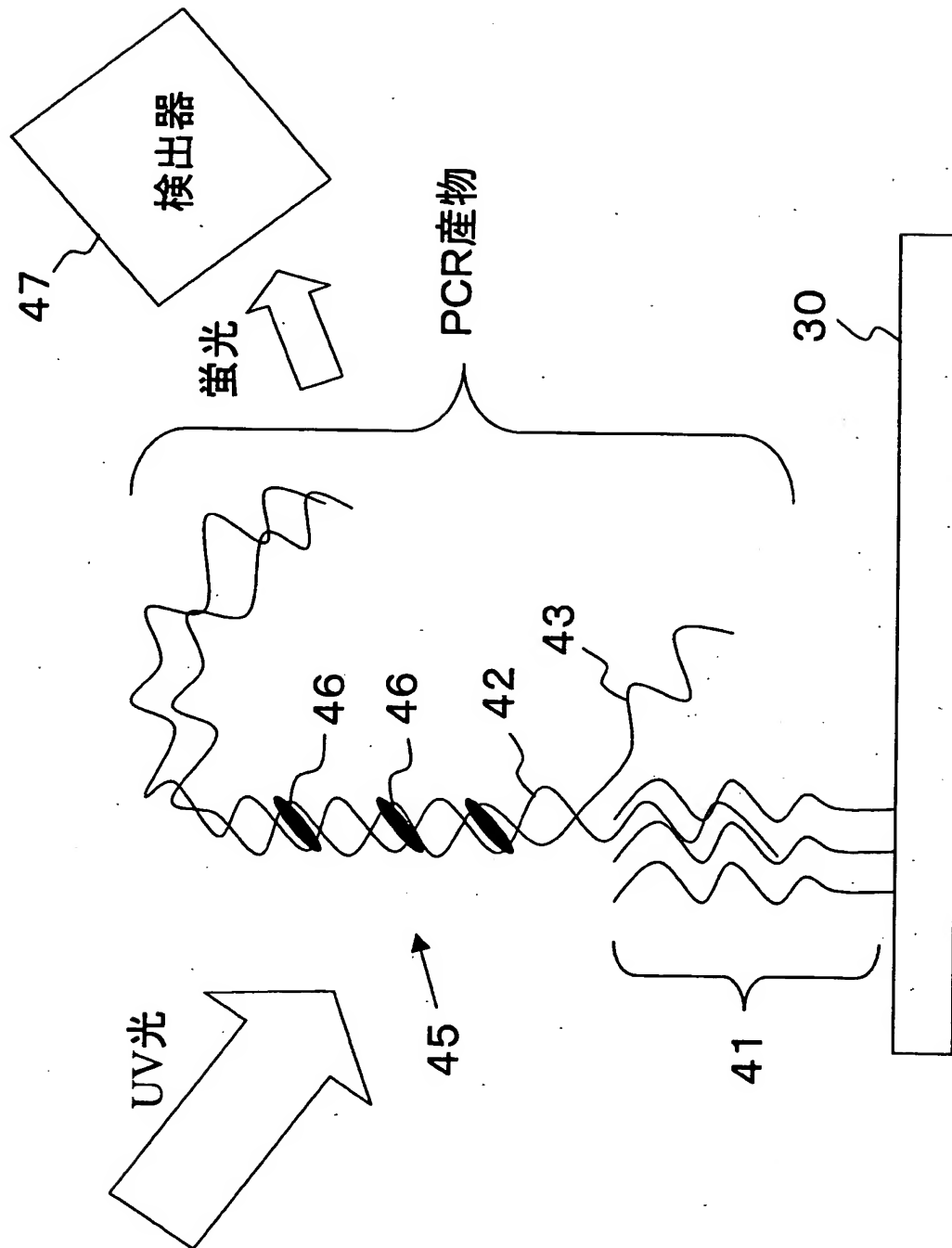
【図 2】



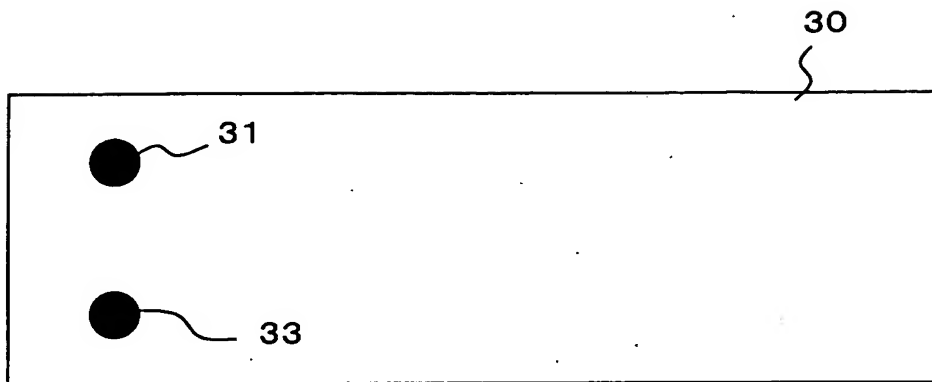
【図 3】



【図4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 多種類のプライマーを用いてPCRした場合でも増幅されたPCR産物の確認を容易かつ確実に行う。

【解決手段】 スライドガラス30上にPCR用のプライマー41を植え付けたバイオチップを用いることにより、1チューブで多種類のプライマーで競合PCRを行い、そのプライマーにより増幅のあったPCR産物の検出を行う。

【選択図】 図4



特 2000-380465

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000233055]

1. 変更年月日 1990年 8月 7日

[変更理由] 新規登録

住 所 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地

氏 名 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社